

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑪

Offenlegungsschrift 24 38 352

⑫

Aktenzeichen:

P 24 38 352.6

⑬

Anmeldetag:

9. 8. 74

⑭

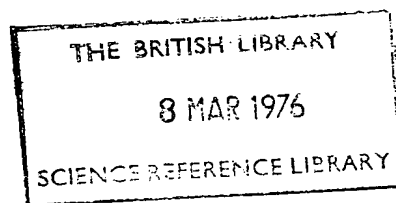
Offenlegungstag:

26. 2. 76

⑳

Unionspriorität:

③② ③③ ③① —



⑤④

Bezeichnung:

Peptidcyclopropylamide mit LH-RH/FSH-RH-Wirkung

⑦①

Anmelder:

Hoechst AG, 6000 Frankfurt

⑦②

Erfinder:

König, Wolfgang, Dr., 6239 Langenhain; Geiger, Rolf, Dr.;
Sandow, Jürgen, Dr.; 6000 Frankfurt

Aktenzeichen:

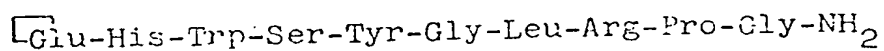
HOE 74/F 227

Datum: 8. August 1974

Dr.HG/Rp

Peptidcyclopropylamide mit LH-RH/FSH-RH-Wirkung

Analoga des Hypothalamushormons LH-RH der Formel



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

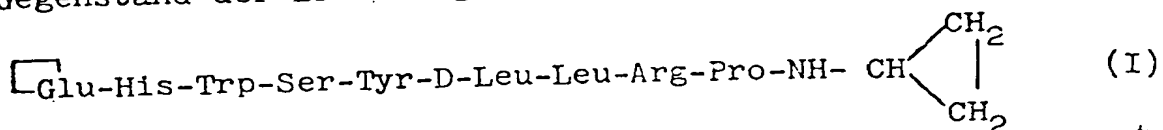
in denen Glycinamid durch Äthyl-, Propyl- oder Isopropylamid ersetzt ist, besitzen nach J. Med. Chem. 16 (1973), Seite 1124, verstärkte biologische Wirkung. In ähnlicher Weise wird die Wirkung des Hormons verstärkt, wenn Glycin in Position 6 durch D-Alanin ersetzt wird. Beim Ersatz von Gly⁶ durch D-Valin, D-Leucin oder D-Prolin nimmt die Wirkung gegenüber dem natürlichen Hormon jedoch ab (Abstr. of the Endocrine Society, 55th

-2-

609809/1007

Ann. Meeting, 1973, Seite A 145). Wird der Austausch von Gly⁶ gegen D-Ala mit demjenigen von Glycinamid¹⁰ gegen die oben genannten Amide miteinander kombiniert, so findet man nach Biochem. Biophys. Res. Commun. 57 (1974), Seite 335, eine weitere Steigerung der biologischen Wirkung.

Gegenstand der Erfindung sind Peptide der allgemeinen Formel I



worin ggf. zusätzlich Tyr durch Phe und Leu⁷ durch Ser(Bu^t), Thr(Bu^t), Asp(OBu^t), Glu(OBu^t), Cys(Bu^t), Lys(Boc) oder Orn(Boc) ersetzt sein kann.

Peptide der allgemeinen Formel I in denen keine Aminosäurebausteine ausgetauscht sind entfalten überraschenderweise im Ovulationstest an der Ratte eine extrem starke biologische Wirkung. Dieser Test stellt das beste Kriterium für die praktische Brauchbarkeit eines solchen Peptids dar, weil er das Integral über die Zeit-Wirkungskurve widerspiegelt. Verfolgt man die zeitliche Ausschüttung von LH, so findet man, daß diese starke Wirkung nicht nur durch die Intensität, sondern vor allem zusätzlich durch die unerwartet lange Wirkungsdauer bedingt ist. Etwa dieselbe integrale Wirkung wird erhalten, wenn zusätzlich Tyr⁵ gegen Phe und/oder Leu⁷ gegen Ser(Bu^t), Thr(Bu^t), Asp(Bu^t), Glu(OBu^t), Cys(Bu^t), Lys(Boc) oder Orn(Boc) ausgetauscht ist. Vor allem der Austausch in Position 7 bewirkt eine bedeutende zusätzliche Verlängerung der LH- und FSH-ausschüttenden Wirkung dieser Verbindungen.

Darüber hinaus sind die Peptide der Formel I auch peroral wirksam. Dieser überraschende Effekt, der bisher an keinem Peptid dieser Kettenlänge beobachtet worden ist, eröffnet neue Therapiemöglichkeiten, und stellen die erfindungsgemäßen Verbindungen über alle bisher dargestellten Analoga des LH-RH. Verbindungen der Formel I worin Leu⁷ durch Lys(Boc) oder Orn(Boc) ersetzt ist, wirken lediglich parenteral, da in diesen beiden Amino-

säurederivaten die Boc-Gruppe gegen Magensäure nicht ausreichend stabil ist. Jedoch sind Analoga mit Aminosäurederivaten in Position 7, die tert.-Butyläther und -estergruppen enthalten, oral wirksam, obwohl auch solche Gruppen in saurem Medium abspaltbar sind.

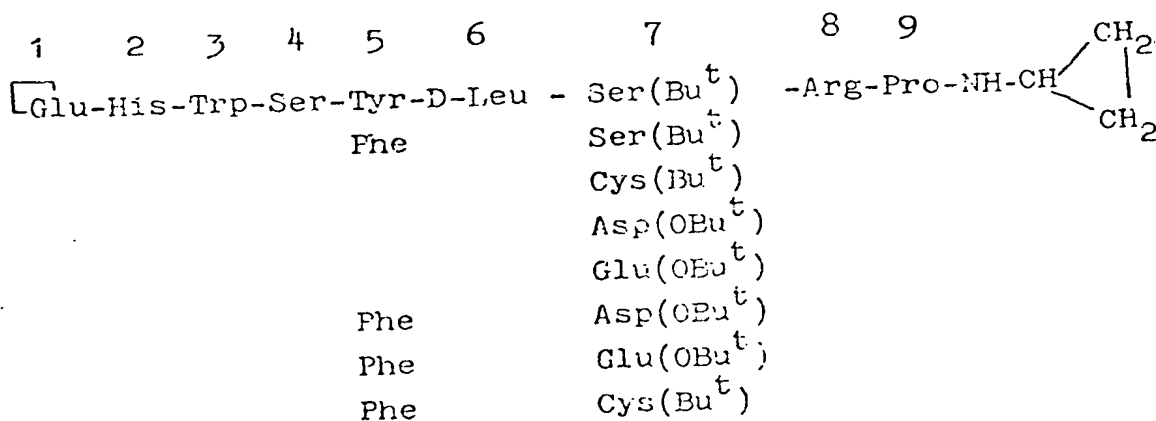
Gegenstand der Erfindung sind ferner Zubereitungen zur peroralen, intranasalen, intramuskulären, subcutanen oder intravenösen Verabreichung des Peptids der Formel II und der oben genannten Analoga sowie Verfahren zu ihrer Herstellung.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung dieser Peptide, dadurch gekennzeichnet, daß man sie

- a) durch in der Peptidchemie übliche Fragmentkondensation von Peptidbruchstücken nach dem Kondensationsschema 1 - 3 + 4 - 10 oder 1 - 2 + 3 - 10 oder
- b) durch stufenweisen Aufbau herstellt,

wobei andere funktionelle Gruppen durch abhydrierbare, oder im alkalischen oder schwach sauren Medium abspaltbare Schutzgruppen ggf. intermediär blockiert werden.

Als Verbindungen mit dem erfindungsgemäßen zusätzlichen Austausch von Aminosäuren in den Positionen 5 und 7 kommen z.B. folgende Verbindungen in Betracht:



Bei der Synthese der Verbindung der Formel II worin Leu nicht ausgetauscht ist, ist die Verwendung von Schutzgruppen nicht kritisch. Als intermediäre α -Aminoschutzgruppe kommen z.B. der Benzyloxycarbonyl- oder der tert.-Butyloxycarbonylrest in Frage. Die Guanidofunktion des Arginins kann ungeschützt bleiben oder durch eine Nitrogruppe blockiert werden, welche bei der nächsten folgenden Hydrierung abgespalten wird. Dasselbe gilt für die Benzyloxycarbonylgruppe. Des weiteren kommt der Tosylrest als Guanidoschutzgruppe in Frage. Er kann, ggf. zusammen mit weiteren sauer abspaltbaren Schutzgruppen, nach beendeter Synthese oder auf einer früheren Synthesestufe durch HF/Anisol entfernt werden. Auch die Nitrogruppe wird durch HF/Anisol abgespalten und kann deshalb z.B. in Kombination mit dem tert.-Butyloxycarbonylrest als α -Aminoschutzgruppe, während der ganzen Synthese zum Schutz der Guanidofunktion eingesetzt werden.

Wenn Leu⁷ durch ein Aminosäurederivat mit säurelabilem tert.-Butylrest ersetzt ist, muß die Abspaltung der Nitro- oder Tosylgruppe durch HF/Anisol schon auf der Dipeptidstufe erfolgen. Dasselbe gilt für einen intermediären Schutz der Amidgruppe.

Als intermediäre α -Aminoschutzgruppen bieten sich für diesen Fall abhydrierbare Gruppen wie z.B. der Benzyloxycarbonylrest oder schwach sauer abspaltbare Gruppen wie z.B. der 2-(p-Diphenyl)-isopropoxyloxycarbonyl- oder 2-(3,5-Dimethoxyphenyl)-isopropoxyloxycarbonylrest an.

Bei der Synthese der schwefelhaltigen Verbindungen müssen Benzyloxycarbonylschutzgruppen durch katalytische Hydrierung in an sich bekannter Weise unter Zugabe einesamins wie z.B. Triäthylamin, N-Äthylmorpholin oder Cyclohexylamin abgespalten werden, da die hydrogenolytische Abspaltung der Schutzgruppe in neutralem oder saurem Milieu in diesem Falle unvorteilhaft ist.

Bei der Fragmentkupplung nach a) verwendet man vorzugsweise die ohne Racemisierung verlaufende Azidkupplung oder die DCC/1-

Hydroxybenzotriazol- bzw. DCC/3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin-Methode. Man kann auch aktivierte Ester von Fragmenten einsetzen.

Für die stufenweise Kondensation von Aminosäuren nach b) eignen sich besonders gut aktivierte Ester von Benzyloxycarbonylamino-säuren, wie z.B. N-Hydroxysuccinimidester oder 2.4.5-Trichlorphenylester und 4-Nitrophenylester. Die Aminolyse der beiden letzteren Aktivester läßt sich sehr gut durch N-Hydroxyverbindungen, die in etwa die Azidität der Essigsäure besitzen, wie z.B. 1-Hydroxybenzotriazol katalysieren.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen zeigen gegenüber den 6-Gly-, aber auch gegenüber den 6-D-Ala-Analogen im Ovulationstest und im Ascorbinsäuredepletionstest eine stärkere und längere Wirkung.

Die orale Wirkung eröffnet diesen Arzneimitteln einen weiteren Anwendungsbereich als den bis jetzt nur parenteral oder nasal applizierbaren LH-RH. Sie stellen neuartige Arzneimittel dar, die bei Hypothalamus- und Hypophysen-Insuffizienz die Ausschüttung des luteininsierenden und des folikelstimulierenden Hormons aus dem Hypophysenvorderlappen bewirken und werden deshalb zur Behandlung von weiblicher und männlicher Sterilität verwendet, soweit diese hypothalamisch-hypophysären Ursprungs ist. Eine weitere Anwendung der erfindungsgemäßen Substanzen ist die Festlegung des Ovulationszeitpunktes bei der Frau. Kurz vor dem erwarteten Ovulationszeitpunkt kann durch Applikation der neuen Arzneimittel eine Ovulation sicher ausgelöst werden. Das ist von Bedeutung für die Familienplanung sowohl nach der Methode Knaus-Ugino als auch für die künstliche Insemination.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind intravenös, intramuskulär oder subcutan applizierbar, können intranasal in Form von Nasentropfen oder Nasenspray und mit der oben genannten Einschränkung auch peroral angewendet werden. Die bei den verschiedenen Anwendungsarten bevorzugt angewandten Dosierungen sind

intravenös	20 -	1000 ng/kg
subcutan	20 -	2000 ng/kg
intramuskulär	20 -	10 000 ng/kg
intranasal	100 -	50 000 ng/kg
peroral	10 000 -	200 000 ng/kg

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen. Sie konnten alle auf einem der erfindungsgemäßen Wege synthetisiert werden.

Die Peptide wurden dünnschichtchromatographisch auf Einheitlichkeit geprüft und durch opt. Drehung, Aminosäureanalyse und OCH_3 -Bestimmung charakterisiert. Berechnete und gefundene Werte stimmen bei allen Peptiden gut überein.

Die Beschreibung der erfindungsgemäßen Zubereitungen stellt nur charakteristische Beispiele für Herstellung und Zusammensetzung der Präparate vor. Es gibt zahlreiche weitere Formulierungsmöglichkeiten, die dem Fachmann jedoch bekannt sind und im Rahmen dieser Erfindung liegen.

Abkürzungen:

DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
OOBT	3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazinester

Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-cyclopropylamid

a) Z-Pro-cyclopropylamid

Zu einer Lösung von 25 g (0,1 Mol) Z-Prolin, 13,5 g (0,1 Mol) HOBT und 5,71 g (0,1 Mol) Cyclopropylamin in 200 ml absolutem Tetrahydrofuran gibt man bei 0°C 22 g DCC, gelöst in 50 ml kaltem absolutem Tetrahydrofuran. Man läßt eine Stunde bei 0°C und drei Stunden bei Raumtemperatur rühren, saugt den Niederschlag ab und engt das Filtrat ein. Der ölige Rückstand wird in Essigester gelöst und nacheinander mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung, 2n HCl, NaHCO_3 -Lösung und Wasser ausgeschüttelt, über Na_2SO_4 getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird mit Petroläther verrieben und abgesaugt. Zur Reinigung wird aus Essigester/Petroläther umkristallisiert. Ausbeute 23 g (= 80 %). Schmp. 120 - 123°, $[\alpha]_D^{24} = -45,5^\circ$ (c=1, in Methanol)

b) H-Pro-cyclopropylamid . HCl

19g Z-Pro-cyclopropylamid werden in 200 ml Methanol gelöst. Dazu gibt man eine Spatelspitze Pd/BaSO₄-Katalysator und hydriert indem man unter Rühren Wasserstoff durch die Lösung leitet. Der pH der Lösung wird mit Hilfe eines Autotitrators durch Zugabe von 1 n methanolischer Salzsäure auf 4,5 gehalten. Der Katalysator wird nach beendeter Hydrierung abgesaugt und das Filtrat eingeeengt. Der Rückstand wird mit Äther verrieben und abgesaugt. Ausbeute 11 g (= 83 %), Schmp. 169 - 173°

c) Z-Arg (Z₂)-Pro-cyclopropylamid

Zu einer Lösung von 28,85 g (50 mmol) Z-Arg (Z₂)-OH, 2,5 g (50 mmol) H-Pro-cyclopropylamid . HCl und 6,75 g (50 mmol) HOBT in 100 ml Methylenchlorid und 25 ml Dimethylformamid gibt man 6,5 ml N-Äthylmorpholin und bei 0° eine Lösung von 11 g DCC in wenig Methylenchlorid. Man läßt eine Stunde bei 0°C und über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Der Niederschlag wird abgesaugt und das Filtrat eingeeengt. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen und mit Wasser, NaHCO_3 -Lösung, 1 n HCl und NaHCO_3 -Lösung gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand kristallisiert aus Essigester/Petroläther. Die Rohsubstanz (26,3 g) wird an einer 250 g-Kieselgelsäule in

Methylenchlorid, Aceton ...
reinholt. Ausbeute 22,2 g (62 %), Schmp. 171 °C
 $[\alpha]_D^{21} = -33,0^\circ$ (c=1, in Methanol)

d) H-Arg-Pro-cyclopropylamid . 2 HCl

22 g (30,9 mmol) Z-Arg (Z₂)-Pro-cyclopropylamid werden in Methanol analog b) katalytisch hydriert.

Der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet. Es resultieren 11 g (89 %) eines amorphen Schaums.

e) Z-D-Leu-Leu-Arg-Pro-cyclopropylamid

Zu einer Lösung von 3,83 g (10 mmol) H-Arg-Pro-cyclopropylamid - 2 HCl in 20 ml Dimethylformamid gibt man bei 0°C 2,6 ml N-Äthylmorpholin und 2,75 g Z-Leu-ONSu. Man läßt über Nacht bei Raumtemperatur stehen, engt ein und verreibt den Rückstand je ein mal mit Essigester und Äther. Man dekantiert die Lösungsmittel ab und trocknet das Öl im Hochvakuum.

Der Rückstand wird in Methanol gelöst und analog b) katalytisch hydriert. Der Rückstand wird mit Äther verrieben und am Hochvakuum getrocknet. Es entstehen 5,45 g amorphes H-Leu-Arg-Pro-cyclopropylamid . 2 HCl, das durch Salze verunreinigt ist

(4,96 g = 100 % bezogen auf H-Arg-Pro-cyclopropylamid . 2 HCl).

Die gesamte Substanz wird zusammen mit 1,35 g HOBT, 2,6 ml N-Äthylmorpholin und 4,4 g Z-D-Leu-OTcp in 20 ml Dimethylformamid gelöst. Man läßt 2 Stunden stehen, engt ein und verreibt den Rückstand 2 mal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung, löst in Methylenchlorid, trocknet über Na₂SO₄, engt ein und verreibt den Rückstand zwei mal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung, löst in Methylenchlorid, trocknet über Na₂SO₄, engt ein und verreibt den Rückstand mit Äther. Ausbeute 4,15 g (62 % bezogen auf H-Arg-Pro-cyclopropylamid . 2 HCl). Die Substanz ist amorph und wird ohne weitere Reinigung weiterverarbeitet.

f) Z-Ser-Tyr (Bzl)-OH

Zu einer Suspension von 5,52 g (20 mmol) H-Tyr (Bzl)-OH in 60 ml Dimethylacetamid gibt man 7,68 g Z-Ser-OObt und rührt sechs Stunden bei Raumtemperatur. Von Ungelöstem wird abgesaugt und das auf 0°C abgekühlte Filtrat mit 300 ml Wasser versetzt. Der

Niederschlag wird abgesaugt, mit Dimethylacetamid/Wasser-Mischung (1:10) und Wasser gewaschen und mit 1 n H_2SO_4 verrührt. Nun wird wieder abgesaugt und mit Wasser gewaschen und getrocknet. Aus Essigester/Petroläther wird umkristallisiert. Ausbeute 7,35 g (75 %), Schmp. 166°C , $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +20,9^\circ$ ($c=1$, Methanol)

g) H-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-cyclopropylamid . 2 HCl

3,35 g (5 mmol) Z-D-Leu-Leu-Arg-Pro-cyclopropylamid werden in Methanol gelöst und analog b) katalytisch hydriert. Der Rückstand wird mit Äther verrieben und am Hochvakuum getrocknet. Ausbeute 2,9 g amorphes Material (95 %).

Obige 2,9 g (4,7 mmol) H-D-Leu-Leu-Arg-Pro-cyclopropylamid. 2HCl werden zusammen mit 2,32 g (4,7 mmol) Z-Ser-Tyr (Bzl)-OH, 635 mg HOBt und 1,22 ml N-Äthylmorpholin in 10 ml Dimethylformamid suspendiert. Bei 0°C gibt man 1,04 g DCC zu und läßt 1 Stunde bei 0°C rühren und über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Der Niederschlag wird anderntags abgesaugt und das Filtrat eingeeengt. Der Rückstand wird zwei mal mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung verrieben, in Methylenchlorid gelöst und die Lösung über Na_2SO_4 getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird mit Äther verrieben und abgesaugt. Es resultieren 3,5 g (71 %) amorphes Z-Ser-Tyr (Bzl)-D-Leu-Leu-Arg-Pro-cyclopropylamid die analog b) katalytisch hydriert werden. Der Rückstand wird mit Äther verrieben und am Hochvakuum getrocknet. Ausbeute 2,92 g (=70 % bezogen auf Z-Ser-Tyr(Bzl)-OH). Die Rohsubstanz wird an unten beschriebener Verteilungschromatographie-Säule gereinigt. Aufbau der Säule: 400 ml Eisessig, 800 ml n-Butanol und 4 Liter Wasser werden geschüttelt. 300 ml der oberen Phase werden mit 240 g Sephadex LH 20^(R) verrührt. Dabei wird das gesamte Lösungsmittel aufgesaugt. Diese so vorbehandelte Säulenfüllung wird in einer entsprechenden Menge der unteren Phase suspendiert. Man läßt 3 Stunden quellen und füllt die Säule (1 m x 4 cm). Mit der unteren Phase wird eluiert.

Ausbeute an chromatographisch reiner Substanz: 1,3 g

$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -43,8^\circ$ ($c=1$, in Methanol)

h) [Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-cyclopropylamid

Zu einer Lösung von 500 mg [Glu-His-Trp-NH-NH₂ in 6 ml Dimethylformamid gibt man bei -30°C 0,66 ml einer 6,05 n HCl/Dioxan-

Lösung und 1,2 ml einer 10-proz. tert.-Butylnitrit-Lösung in absolutem Dioxan. Man läßt 20 Minuten bei -10°C rühren und gibt bei -40°C 860 mg H-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-cyclopropylamid $\cdot 2 \text{ HCl}$ und 0,78 ml N-Äthylmorpholin zu. Man läßt über Nacht im Kühlschrank bei 4°C stehen, engt ein und verreibt den Rückstand mit Äther. Die Substanz wird in Wasser gelöst und über Dowex^(R) 1 x 2 (Acetat-Form) chromatographiert. Das Eluat wird eingengt und über eine Carboxymethylcellulosesäule (90x1,5cm), die mit 0,002 m NH_4 -acetat-Lösung äquilibriert ist, gereinigt. Die Substanz wird gelöst in 0,002 m NH_4 -acetat-Lösung aufgegeben. Eluiert wird mit einer 0,002 m NH_4 -acetat-Lösung, der ein Gradient einer 0,1 m NH_4 -acetat-Lösung angelegt wird (Mischvolumen 250 ml).

Die Fraktionen, die das gewünschte Peptid enthielten wurden zwei mal gefriergetrocknet. Ausbeute 405 mg chromatographisch reine Substanz. Der Gehalt an Peptidbase ist laut UV-Spektrum 77 % (Ausbeute 26 %). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -39,9^{\circ}$ ($c=1$, in Dimethylacetamid)

Beispiel 2:

Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Ser(Bu^t)-Arg-Pro-cyclopropylamid

a) H-Ser(Bu^t)-Arg-Pro-cyclopropylamid $\cdot 2 \text{ HCl}$

Zu einer Lösung von 2,3 g (6 mmol) H-Arg-Pro-cyclopropylamid $\cdot 2 \text{ HCl}$ und 810 mg HOBT in 10 ml Dimethylformamid gibt man 1,56 ml N-Äthylmorpholin und 3,12 g Z-Ser(Bu^t)-OTcp und rührt 2 Stunden bei Raumtemperatur. Danach wird im Vakuum eingengt, der Rückstand in Essigester gelöst und die Lösung zwei mal mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt, über Na_2SO_4 getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird mit Äther verrieben und am Hochvakuum getrocknet. Es werden 2,4 g amorphe Substanz erhalten, die analog Beispiel 1 b in Methanol katalytisch hydriert werden. Ausbeute 2,8 g (88 %) amorphe Substanz. Dünnschichtchromatographisch nicht einheitlich (durch etwa 3 Nebenprodukte verunreinigt).

b) H-D-Leu-Ser(Bu^t)-Arg-Pro-cyclopropylamid $\cdot 2 \text{ HCl}$

Zu einer Lösung von 2,62 g (5 mmol) H-Ser(Bu^t)-Arg-Pro-cyclopropylamid $\cdot 2 \text{ HCl}$ und 675 mg HOBT in 5 ml Dimethylformamid gibt man bei 0°C 1,3 ml N-Äthylmorpholin und 2,22 g Z-D-Leu-

OTcp zu. Man läßt über Nacht stehen, engt ein und löst den Rückstand in Essigester. Mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung wird 2 mal ausgeschüttelt, über Na_2SO_4 getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird mit Äther verrieben und am Hochvakuum getrocknet. Ausbeute 2,4 g einer amorphen Substanz, die analog Beispiel 1 b in Methanol katalytisch hydriert wird. Der Rückstand wird mit Äther verrrieben. Ausbeute 2,1 g einer amorphen Substanz (66 % bezogen auf Z-D-Leu-OTcp. Die Substanz wird ohne weitere Reinigung weiterverarbeitet.

c) H-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Ser(Bu^t)-Arg-Pro-cyclopropylamid . 2 HCl

Zu einer Lösung von 1,99 g (3,3 mMol) Z-Trp-Ser-Tyr-NH-NH₂ in 25 ml Dimethylformamid gibt man bei - 30°C 2,18 ml einer 6,05 n HCl/Dioxan-Lösung und 3,97 ml einer 10-prozentigen tert.-Butylnitrit-Lösung in absolutem Dioxan. Man läßt 20 Minuten bei - 10°C rühren und gibt bei - 40°C 2,6 ml N-Äthylmorpholin und 2,1 g (3,3 mMol) H-D-Leu-Ser(Bu^t)-Arg-Pro-cyclopropylamid . 2 HCl zu. Man läßt über Nacht im Kühlraum bei 4°C stehen, engt ein und verreibt den Rückstand mit Äther. Analog Beispiel 1 b wird hydriert und die Rohsubstanz analog Beispiel 1 g an Sephadex LH 20 chromatographisch gereinigt. Ausbeute an reiner amorpher Substanz 1,25 g (35 %)

d) \square Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Ser(Bu^t)-Arg-Pro-cyclopropylamid-diacetat

Zu einer Lösung von 538 mg (0,5 mMol) H-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Ser(Bu^t)-Arg-Pro-cyclopropylamid . 2 HCl, 151 mg (0,5 mMol) \square Glu-His-OH und 135 mg HOBT in 5 ml Dimethylformamid gibt man bei 0°C 0,13 ml N-Äthylmorpholin und 110 mg DCC. Man läßt 1 Stunde bei 0°C und über Nacht bei Raumtemperatur stehen, saugt den Niederschlag ab, engt ein, und verreibt den Rückstand mit Äther. Man löst in Wasser, filtriert von Unlöslichem und reinigt analog Beispiel 1 h über Dowex 1 x 2 und Carboxymethylcellulose. Anschließend wird noch über Sephadex LH 20 analog Beispiel 1 g gereinigt. Ausbeute 165 mg. Der Gehalt an Peptid ist laut UV-Spektrum 78% (20,5 % Ausbeute)

$[\alpha]_D^{23} = - 28,9^\circ$ (c=1, in Dimethylacetamid)

Beispiel 3 (Zubereitung zur oralen Anwendung):

10 g \square Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-cyclopropylamid-diacetat werden mit 542 g Lactose verrieben. Man mischt die Verreibung mit 300 g Kartoffelstärke, befeuchtet mit der alkoholischen Lösung von 8 g Gelatine und granuliert. Nach dem Trocknen mischt man 60 g Kartoffelstärke, 10 g Magnesiumstearat, 20 g hochdisperses Siliciumoxid und 60 g Talk zu und preßt die Mischung zu 10 000 Tabletten von je 150 mg Gewicht. Jede Tablette enthält 1 mg Wirkstoff.

Beispiel 4 (Zubereitung zur intranasalen Anwendung):

4,0 g \square Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Ser(Bu^t)-Arg-Pro-cyclopropylamid-diacetat werden in 100 ml dest. Wasser gelöst. Gleichzeitig löst man 31,2 g NaHPO₄ · 2 H₂O, 66,29 g Na₂HPO₄, 25 g Natriumchlorid und 100 g Benzylalkohol in 8 l dest. Wasser und gibt 500 g Polyvinylalkohol mit einem K-Wert von ca. 90 zu. Die beiden Lösungen werden vereinigt und filtriert. Die Einzeldosis von 20 µg ist in 0,05 ml enthalten.

Beispiel 5 (Zubereitung zur intranasalen Anwendung):

100 g wasserfreies Lanolin und 440 g Vaseline werden zusammengesmolzen. Zu der erkalteten Schmelze gibt man eine Suspension von 800 mg mikrofeinem \square Glu-His-Trp-Ser-Phe-D-Leu-Ser(Bu^t)-Arg-Pro-cyclopropylamid-diacetat in 359,2 g flüssigem Paraffin. Zum Schluß werden 10 g Benzylalkohol dazugegeben und die Salbe homogenisiert. Die Einzeldosis von 40 µg ist in 0,05 g Salbe enthalten.

Beispiel 6 (Zubereitung für Injektionen):

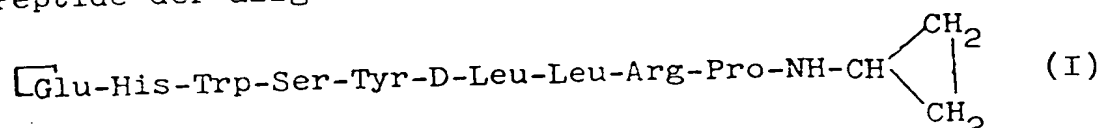
Man löst 2 mg \square Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-cyclopropylamid-diacetat in 500 ml bidest. Wasser und versetzt mit 100 ml Phosphatpuffer pH 4,5. Dann gibt man 1 g Mannit und die errechnete Menge NaCl zur Isotonie zu und füllt mit Wasser auf 1 l auf. Nach Sterilfiltration wird in Ampullen zu 1 bzw. 2 ml abgefüllt und lyophilisiert.

Beispiel 7 (Zubereitung für Injektionen):

Man arbeitet nach Beispiel 6, gibt aber vor dem Auffüllen mit Wasser 2,5 g 4-Hydroxybenzoesäuremethylester zu. Nach Sterilfiltration wird in Ampullen zu 1 oder 2 ml abgefüllt.

PATENTANSPRÜCHE:

- 1) Peptide der allgemeinen Formel I



worin ggf. zusätzlich Tyr durch Phe und Leu⁷ durch Ser(Bu^t), Thr(Bu^t), Asp(OBu^t), Glu(OBu^t), Cys(Bu^t), Lys(Boc) oder Orn(Boc) ersetzt sein kann.

- 2) Verfahren zur Herstellung von Peptiden gemäß Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß man sie
- durch in der Peptidchemie übliche Fragmentkondensation von Peptidbruchstücken nach dem Kondensationsschema 1 - 3 + 4 - 10 oder 1 - 2 + 3 - 10 oder
 - durch stufenweisen Aufbau herstellt, wobei andere funktionelle Gruppen durch abhydrierbare, oder im alkalischen oder schwach sauren Medium abspaltbare Schutzgruppen ggf. intermediär blockiert werden.
- 3) Pharmazeutische Zubereitungen zur peroralen, intranasalen, intramuskulären, subcutanen oder intravenösen Verabreichung bestehend aus oder enthaltend Verbindungen gemäß Anspruch 1.
- 4) Pharmazeutische Zubereitungen zur peroralen Verabreichung bestehend aus oder enthaltend Verbindungen gemäß Anspruch 1.
- 5) Verfahren zur Herstellung von pharmazeutischen Zubereitungen gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen gemäß Anspruch 1 ggf. mit pharmazeutisch üblichen Trägerstoffen und/oder Stabilisatoren in eine für therapeutische Zwecke geeignete Anwendungsform bringt.